

胃乐散对大鼠胃溃疡黏膜碳酸氢盐转运蛋白 CFTR、SLC26A3 及 SLC26A6 的作用

文国容¹ 徐靖宇¹ 刘雪梅¹ 赵正兰¹ 江义霞¹ 谢 睿¹ 陈 萍² 余丽梅³ 庾必光¹

摘要 目的 研究胃乐散对大鼠胃溃疡黏膜碳酸氢盐分泌的影响,并探讨其作用机制。**方法** SD 大鼠 48 只,随机分为正常对照组,模型组,胃乐散低剂量组[0.075 g/(mL·kg)]、中剂量组[0.150 g/(mL·kg)]、高剂量组[0.300 g/(mL·kg)]和雷尼替丁组[0.030 g/(mL·kg)],每组 8 只。采用冰醋酸烧灼法制备大鼠胃溃疡模型,制模后第 2 天,各用药组开始给药,连续用药后第 14 天处死大鼠,取溃疡部位组织提取蛋白,用免疫印迹法(Western blot)检测组织 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 离子交换体 solute carrier26A3 (SLC26A3) 及 solute carrier26A6 (SLC26A6) 的含量;将大鼠胃溃疡及周围组织切片,用免疫荧光法观察囊性纤维化跨膜转运调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)的变化。**结果** 与模型组比较,用药后胃乐散高剂量组及雷尼替丁组大鼠胃黏膜中 SLC26A3 的表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);雷尼替丁组,胃乐散中、高剂量组大鼠胃黏膜中 SLC26A6 的表达均增加,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);胃乐散中、高剂量组大鼠胃溃疡黏膜的 CFTR 表达也明显增加,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 胃乐散能提高大鼠胃溃疡黏膜 SLC26A3、SLC26A6 和 CFTR 的表达,增加碳酸氢盐的分泌,保护胃黏膜。

关键词 胃乐散;胃溃疡;离子交换体 26A3;离子交换体 26A6;囊性纤维化跨膜转运调节因子;免疫荧光法;免疫印迹法

Effects of Weile Powder on Bicarbonate Transporters CFTR SLC26A3 and SLC26A6 in Gastric Ulcers of Rats WEN Guo-rong¹, XU Jing-yu¹, LIU Xue-mei¹, ZHAO Zheng-lan¹, JIANG Yi-xia¹, XIE Rui¹, CHEN Ping², YU Li-mei³, and TUO Bi-guang¹ 1 Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Guiyang (563000), China; 2 Department of Pharmacy, Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Guiyang (563000), China; 3 Key Laboratory of Cell Engineering, Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Guiyang (563000), China

ABSTRACT Objective To investigate the effects of Weile Powder (WLP) on bicarbonate transporters in rats with gastric ulcers, and to probe its functional mechanisms. **Methods** The 48 SD rats were randomly divided into the normal control group, the model group, the low dose WLP group (at the daily dose of 0.075 g/mL), the middle dose WLP group (at the daily dose of 0.150 g/mL), the high dose WLP group (at the daily dose of 0.300 g/mL), and the ranitidine group (at the daily dose of 0.030 g/mL), 8 in each group. The gastric ulcer rat model was prepared by the glacial acetic acid cauterization method. Rats in each medication group were administered from the 2nd day of modeling. Rats were sacrificed after 14-day successive medication. The protein was extracted from the ulcer tissue. The protein expressions of solute carrier26A3 (SLC26A3) and solute carrier26A6 (SLC26A6) were detected using Western blot. The gastric ulcer and its peripheral tissue were sectioned. The changes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) were measured by immunofluorescence. **Results** Compared with the model control group, the expression levels of SLC26A3 increased in the high dose WLP group and the ranitidine group with statistical difference ($P < 0.05$). The expression levels of SLC26A6 increased in the high and middle dose WLP groups and the ranitidine group with statistical difference ($P < 0.05$). The ex-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30860092);贵州省中医药管理局基金资助项目[黔中医药发(2009)79号]

作者单位:1.遵义医学院附属医院消化内科(贵州遵义 563000);2.遵义医学院附属医院药剂科(贵州遵义 563000);3.遵义医学院贵州省细胞工程重点实验室(贵州遵义 563000)

通讯作者:庾必光, Tel:0852-8608230, E-mail:tuobiguang@yahoo.com.cn.

pression level of CFTR also obviously increased in the high and middle dose WLP groups ($P < 0.01$). Conclusion WLP could elevate the expression levels of SLC26A6, SLC26A3, and CFTR, increase the secretion of bicarbonate, thus protecting the gastric mucosa.

KEYWORDS Weile Powder; SLC26A3; SLC26A6; cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; immunofluorescence; Western blot; gastric ulcer

胃乐散由白芍、苍术、元胡、肉桂等 6 味中药组成,前期研究发现,胃乐散对实验性胃溃疡有很好的疗效,但作用机理不详^[1]。有研究表明胃和十二指肠黏膜的碳酸氢盐分泌是胃、十二指肠黏膜防止胃酸、胃蛋白酶损害的重要保护因素^[2]。本实验就胃乐散对碳酸氢盐转运蛋白囊性纤维化跨膜转运调节因子(cystic fibrosis transmembrane regulator, CFTR), $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 离子交换体,如 solute carrier26Ax 家族(SLC26A3, SLC26A6)等的作用进行研究,为胃乐散临床应用提供一定的理论基础。

材料与方法

1 动物 SD 大鼠 48 只,月龄 2~3 个月,体重(200 ± 20)g,雌雄各半。由重庆第三军医大学提供,SPF 级许可证号:SCXK(渝)2007-0005。大鼠自由饮食,光照/暗时间为 12/12 h 循环,室温 22~23℃。

2 主要药物和试剂 主要药物:胃乐散(白芍、苍术、元胡、肉桂等 6 味中药组成,全药材入药,磨成粉剂)由遵义医学院药理学教研室与贵阳春科药物研发股份有限公司联合研制,临用前用蒸馏水配成 3.00%、1.50%、0.75% 的混悬液备用;雷尼替丁胶囊:规格为 0.150 g/片,用药剂量为 0.030 g/(mL·kg),中诺药业有限公司生产,批号:09105885。主要试剂:BCA 蛋白定量试剂盒(GeneRay Biotech Co.ltd);SLC26A3(sc-34939, Santa Cruz Biotechnology, inc);二抗(ZB-2306, 北京中杉生物有限公司);SLC26A6(sc-26728, Santa Cruz Biotechnology, inc);二抗(CAM007, 联科生物有限公司);CFTR(sc-10747, Santa Cruz Biotechnology, inc);FITC 荧光二抗(83231, 北京中杉生物有限公司 Jackson Immuno Research);DIPA(Sigma 公司);Actin 一抗(sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, inc);二抗(ZB-2301, 北京中杉生物有限公司)。

3 主要仪器 Thermo 全波长酶标仪(Thermo Scientific, 美国), Bio-Rad 电泳仪(奥林巴斯产业株式会社, 日本)。

4 动物造模及给药 SD 大鼠 48 只,随机分成

6 组,每组 8 只,分别为正常对照组(不造模)、模型组、雷尼替丁组、胃乐散低剂量组、胃乐散中剂量组、胃乐散高剂量组。实验方法及模型制备参考文献[1],制模术前禁食 24 h,自由饮水,乙醚麻醉,大鼠仰卧固定于解剖板上,上腹部备皮,常规碘伏消毒,沿大鼠剑突下上腹正中偏左纵行切开皮肤,切口长 1.5~2.0 cm,沿腹白线剪开腹壁组织打开腹腔,以无齿镊拨开肠管,暴露胃,用内径 6.0 mm,长 2.0 cm 的玻璃管,紧贴于胃前壁,近幽门处的胃底部,向玻璃管内注入 100% 乙酸 0.1 mL,1 min 后立即用棉签拭去乙酸,然后用蘸生理盐水的棉球轻轻抹洗 2 次,此时可见溃疡成圆形,中心凹陷,四周微微隆起,将胃还纳于腹腔内,逐层缝合腹壁。大鼠制模成功后,于术后第 2 天开始灌胃给药,雷尼替丁组 0.03 g/(mL·kg)、胃乐散低剂量组 0.075 g/(mL·kg)、胃乐散中剂量组 0.150 g/(mL·kg)、胃乐散高剂量组 0.300 g/(mL·kg),高、中、低剂量组分别相当于临床用量的 40、20、10 倍。模型组和正常对照组分别给予等量生理盐水。每日早 9:00 时、晚 5:00 时各给药 1 次,连续给药 14 天。

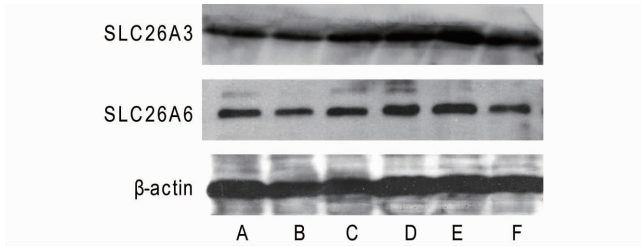
5 观察指标 大鼠胃溃疡黏膜组织 SLC26A3、SLC26A6 及 CFTR 的测定:溃疡模型制备手术后第 14 天,用 3% 戊巴比妥钠 0.1 mL/100 g 麻醉大鼠,取胃组织,用生理盐水洗净,于 -80℃ 冰箱内保存备用。实验时取大鼠胃溃疡部位及周围组织,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,并定量为 100 μg,用 Western blot 法测量组织中 SLC26A3 及 SLC26A6 的水平,并同步检测内参肌动蛋白 β-actin。Western Blotting 操作步骤:将上述提取的蛋白 100 μg/10 μL 加入等量的 2×上样缓冲液,100℃ 煮沸 5 min 后上样,然后进行电泳、电转,转膜后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h,然后加入一抗在含 1% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中,轻摇,4℃ 过夜,次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入用 TBST 稀释的二抗,在室温下作用 1 h,洗膜 3 次,每次 10 min,加入 ECL 发光剂作用 1 min 后曝光。用软件 IPWin60 测量目的蛋白条带积分光密度值(IOD),其结果用目的条带 IOD 值除以相应组的内参条带 IOD 值表示。免疫荧光操作步骤:石蜡切片脱蜡后,用 pH 6 的枸橼酸盐修复抗原(微波,

中火10 min),室温放置自然冷却,PBS 冲洗 5 min × 3 次,滴加 1:100 浓度的 CFTR,4 ℃ 过夜。用 PBS 替代一抗作为空白对照,次日取出,室温放置 10 min, PBS 洗 5 min × 3 次,,滴加 1:50 稀释 FITC 标记二抗,37 ℃ 孵育 45 min, PBS 洗 5 min × 3 次,滴加浓度为 5 μg/mL 的 DIPA 复染细胞核 2 min, PBS 洗 5 min × 3 次,封片,用共聚焦显微镜进行观察,黄色为 CFTR 的表达,蓝色为细胞核。

6 统计学方法 应用 SPSS 11.0 统计分析软件对数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组比较采用方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠胃溃疡黏膜 SLC26A3、SLC26A6 的表达结果比较(图 1,表 1) 与正常对照组比较,模型组 SLC26A3、SLC26A6 降低,但差异无统计学意义(*P* > 0.05);与模型组比较,用药后胃乐散高剂量组及雷尼替丁组大鼠胃黏膜中 SLC26A3 的表达增加,差异有统计学意义(*P* < 0.05);与模型组比较,用药后雷尼替丁组,胃乐散中、高剂量组大鼠胃黏膜中 SLC26A6 的表达均增加,差异有统计学意义(*P* < 0.05,*P* < 0.01)。



注: A 为正常对照组;B 为模型组;C 为胃乐散低剂量组;D 为胃乐散中剂量组;E 为胃乐散高剂量组;F 为雷尼替丁组

图 1 各组大鼠胃溃疡黏膜 SLC26A3、SLC26A6 的表达结果比较

表 1 各组大鼠胃溃疡黏膜 SLC26A3、SLC26A6 的表达结果比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	SLC26A3	SLC26A6
正常对照	8	0.41 ± 0.16	0.49 ± 0.08
模型	8	0.33 ± 0.11	0.41 ± 0.07
胃乐散低剂量	8	0.42 ± 0.16	0.47 ± 0.11
胃乐散中剂量	8	0.44 ± 0.19	0.52 ± 0.10 *
胃乐散高剂量	8	0.60 ± 0.22 *	0.90 ± 0.08 **
雷尼替丁	8	0.53 ± 0.16 *	0.53 ± 0.08 *

注:与模型组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01;下表同

2 各组大鼠胃溃疡黏膜 CFTR 的表达结果比较(图 2,表 2) 与正常对照组比较,模型组 CFTR 的表达有所增加,但差异无统计学意义(*P* > 0.05);与模型组比较,用药后胃乐散中、高剂量组大鼠胃溃疡黏膜的 CFTR 表达均明显增加,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。

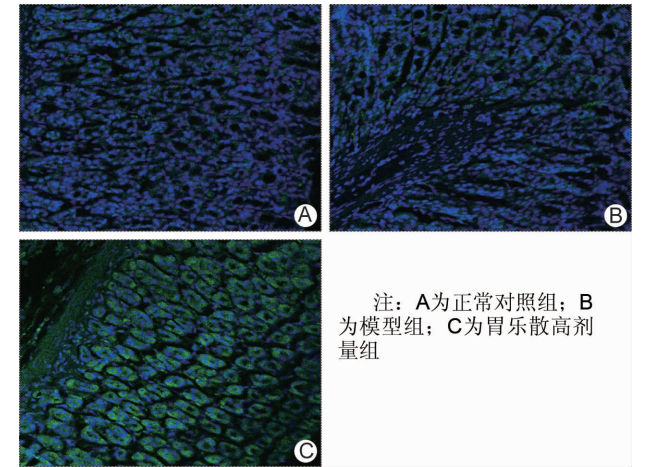


图 2 大鼠胃溃疡黏膜 CFTR 的表达 (免疫荧光染色法, ×200)

表 2 大鼠胃溃疡黏膜 CFTR 的表达结果比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)		
组别	<i>n</i>	灰度值
正常对照	8	30.65 ± 8.85
模型	8	33.41 ± 7.89
雷尼替丁	8	44.29 ± 15.87
胃乐散低剂量	8	33.89 ± 9.34
胃乐散中剂量	8	58.08 ± 7.89 **
胃乐散高剂量	8	66.86 ± 15.7 **

讨 论

目前中医药治疗胃溃疡在临床和实验研究上取得了很大的进展,显示了较好的疗效。通过建立适当的实验性胃溃疡动物模型,并在此基础上观察各项指标的变化和治疗效果,是开展中医药治疗胃溃疡机理研究的重要方法。中医药对实验性胃溃疡的治疗作用主要是从减弱胃溃疡的攻击因子(主要指胃酸、丙二醛、胃蛋白酶、胃泌素、HP 等)、增强胃黏膜防御因子(主要指超氧化物歧化酶、表皮生长因子、前列腺素、血浆内皮素、一氧化氮、胃黏膜血流量、HCO₃⁻ 和黏液的分泌、细胞膜的完整性等)的保护作用和增强胃动力、改善中枢神经功能的传导等方面考虑^[3]。

胃肠道长期暴露于各种侵袭性因素而能保持其完整性,是多种黏膜防御机制共同作用的结果。胃、肠黏膜主要的防御机制包括 HCO₃⁻ 分泌,黏液屏障,黏膜

屏障和黏膜血流,其中最主要的防御机制是胃、肠的 HCO_3^- 分泌。它是胃、肠黏膜对抗胃酸、胃蛋白酶损害的重要保护因素, HCO_3^- 分泌除了受神经体液因素的影响外,黏膜上皮细胞的 HCO_3^- 转运蛋白在 HCO_3^- 分泌的调控中也起着重要的作用。研究表明在胃、十二指肠黏膜上皮细胞尖端侧存在有 HCO_3^- 转运蛋白,如 CFTR 和 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 离子交换体,如 SLC26A_x 家族(SLC26A3,SLC26A6)等。这些 HCO_3^- 转运蛋白调控上皮细胞的 HCO_3^- 分泌^[2]。大量的研究表明在胃、十二指肠上皮细胞与 HCO_3^- 分泌有关的转运蛋白主要是 CFTR 和 SLC26A_x 家族^[2],其中 CFTR 是胃、十二指肠上皮细胞主要的 HCO_3^- 转运蛋白,在上皮细胞的 HCO_3^- 分泌中起着重要的作用。CFTR 介导了细胞内主要信号分子 cAMP、cGMP、 Ca^{2+} 刺激的胃、十二指肠上皮细胞的 HCO_3^- 分泌^[4]。另外,研究表明 CFTR 与 SLC26 相互作用调节胃、十二指肠上皮细胞的 HCO_3^- 分泌^[5,6];鼠类 SLC26A6 和 SLC26A3 通过 SLC26 的 STAS 结构域与 CFTR 的 R 结构域相互作用,导致活性互相增强^[7]。

在 SLC26A_x 家族中,SLC26A3 和 SLC26A6 作为胃、十二指肠黏膜上皮细胞顶部的 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 离子交换体,在胃、肠黏膜 HCO_3^- 分泌中同样也发挥了重要作用^[8]。

在我们前期实验中已发现胃乐散具有良好的治疗胃溃疡的功效,但其抗胃溃疡机理不详^[1],本实验就其对 HCO_3^- 转运蛋白 CFTR、SLC26A3 及 SLC26A6 的调节进行了研究,结果发现,胃乐散能上调 CFTR、SLC26A3 及 SLC26A6 的表达。其机制可能是 CFTR、SLC26A3 及 SLC26A6 调节上皮细胞的 HCO_3^- 转运,而胃肠最主要的防御机制是上皮细胞的 HCO_3^- 分泌,此外,CFTR 还在调节液体流动、细胞内

离子浓度,特别是氢离子浓度等方面有着重要的作用,使胃黏膜免于胃酸、胃蛋白酶的损害,进而保护胃黏膜,这是其促进溃疡愈合的机制之一。

参 考 文 献

- [1] 余丽梅,邓江,文国容,等.胃乐散对实验性胃溃疡的作用[J].遵义医学院学报,2001,24(5):388-390.
- [2] Flemstrom G, Isenberg JI. Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection[J]. Physiology, 2001, 16(1): 23-28.
- [3] 潘凯.中医药治疗实验性胃溃疡的研究进展[J].浙江中西医结合杂志,2009,19(1):57-59.
- [4] Tuo BG, Wen GR, Zhang YL, et al. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in cAMP-and cGMP-induced duodenal epithelial CFTR activation in mice[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 297(9): c503-c515.
- [5] Lohi H, Lamprecht G, Markovich D, et al. Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 284(3): 69-79.
- [6] Kos BH, Zeng WZ, Dorwart MR, et al. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters[J]. Nature Cell Biol, 2004, 6(4): 43-50.
- [7] Ishiguro H, Steward M, Naruse S, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and SLC26 transporters in HCO_3^- -secretion by pancreatic duct cells[J]. Acta Physiologica Sinica, 2007, 58(4): 465-476.
- [8] Ko SB, Shcheynikov N, Choi JY, et al. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO_3^- -transport in cystic fibrosis[J]. EMBO J, 2002, 21(21): 5662-5672.

(收稿:2011-09-30 修回:2012-09-21)